

生物物理学的手法による色素膜タンパク質複合体の構造に関する研究

著者	村岡 義之
号	3005
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/8277

氏名	むらおか よしゆき
授与学位	村岡 義之 博士(工学)
学位授与年月日	平成15年3月24日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程)生物工学専攻
学位論文題目	生物物理化学的手法による色素膜タンパク質複合体の構造に関する研究
指導教官	東北大学教授 野澤 庸則
論文審査委員	主査 東北大学教授 野澤 庸則 東北大学教授 熊谷 泉 東北大学教授 末永 智一

論文内容要旨

[第1章:序章]

光生物における光エネルギーを吸収する器官は、Light-harvesting complex(LH)と呼ばれ、Bacteriochlorophyll(BChl) *a* とそれを保持するための膜タンパク質から構成される色素膜タンパク質複合体である。LH には反応中心の周囲を取り囲むようにして存在する LH1 と、単独で存在する LH2 の二種類が存在し、そのアミノ酸配列から、すべての紅色光合成細菌由来 LH には共通に存在するヒスチジン(His)残基を保持している。LH1 の活性部位周辺の構造は、同じ色素膜タンパク質複合体である LH2 の X 線結晶構造解析から、His 残基中に存在するイミダゾール環の Ne2 位の窒素が BChl *a* の Mg に配位していると考えられている(Fig)。しかし、LH1 を構成するサブユニットは疎水性の強い膜タンパク質であり、試料の単離・精製が困難であることから詳細な構造はいまだに解明されていない。一方、LH1 は界面活性剤である *n*-octyl- β -D-glucopyranoside(OG)により、リング状の構造から近赤外領域の 820nm に吸収極大をもつ B820 と呼ばれる構造単位を生成することが知られている。B820 は α , β ポリペプチドと BChl *a* からなるサブユニットと考えられ、その構造と機能について様々な研究がなされてきた。しかし、従来の B820 再構成濃度では、その解析は吸光分光法やラマン分光法に限られており、新たな手法で解析するには高濃度の B820 の再構成が課題とされてきた。そこで本研究では、BChl *a* ならびに光捕集系タンパク質の構造と機能を解明することを目的とし、紅色光合成細菌である *Rhodospirillum*(*Rsp.*) *rubrum* 由来の色素膜タンパク質複合体である B820 再構成を高濃度で達成し、独自の生物物理化学的手法を用いて、B820 の特性について色素、タンパク質の両面から検討を行った。



Fig. LH1 内の His 周辺の推定構造

[第2章:紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* LH1 サブユニット(B820)の高濃度再構成法]

本章では、従来希薄系で行われていた B820 再構成の手法を大幅に改良することにより、これまでの再構成と比較して、100 倍以上の非常に高い濃度(2mM 以上)で B820 再構成複合体を作製することに成功した。これまで希薄系の B820 再構成に用いられていた LH1 の抽出方法を改善することで、このように高い濃度を達成することが可能となった。高濃度 B820 再構成複合体は、溶液状態で長時間にわたって構造的安定性が高いことが示され、作製するにあたり課題となって

いた試料の安定性の問題を克服した。また、LH1 を構成する α ポリペプチド、 β ポリペプチド、BChl *a* の特性を解析したところ、再構成に悪影響を及ぼす要因はポリペプチドの酸化や BChl *a* のヒドロキシ化に代表されるように、多くは試料の精製度に依存することを示した。これら LH1 の構成成分の性質を知ることで、試料の精製度を高め B820 再構成複合体の構造的均一性を高めることが可能となった。この結果から、これまで B820 を解析する手法がラマン分光法に代表される分光学的手法に限られていたが、これ以外の様々な解析手法に応用する道を開くことに成功した。

[第3章:小角中性子散乱による LH1 及び B820 の特性評価]

本章では、第二章で確立した高濃度 B820 の再構成を行う手法を中性子小角散乱法に応用し、さらに重水素化された OG により、界面活性剤のマスキングを行うことで、LH1 の詳細な会合状態について解析することに成功した。これまで、再構成 B820 と Native B820 では作製方法が異なり、高濃度下で全く同一条件での構造を比較することは困難であったが、試料の最適化を行うことで再構成 B820 と Native B820 が全く同一の構造をとることが示された。このことは、再構成 B820 の解析が LH1 の構造を解析する手段として非常に有用であることを意味する。解析の結果、B820 はアポ型の状態では不均一な構造であるが、色素である BChl *a* が導入されることではじめて均一な構造をとることが示された。さらに、 α 、 β ポリペプチドでは、全く異なる会合状態をとることが明らかとなった。また、B820 のサイズ評価をおこなったところ、*Rsp. rubrum* 由来 B820 の回転半径は、 $11.0 \pm 1.0 \text{ \AA}$ 、分子量が $11,400 \pm 500 \text{ Da}$ であることから、B820 が BChl *a* のダイマーである $\alpha\beta(\text{BChl } a)_2$ の構造をとることを実験により証明することに成功した。この構造は、LH2 と比較すると、よりコンパクトな構造をとることから、LH1 は LH2 と明らかに異なるコンフォメーションをとることが予想される。さらに、B820 のサブユニットが会合した B880、B873 のサイズ評価をおこなったところ、*Rsp. rubrum* 由来 B820 の回転半径は、 65 \AA と 141 \AA の二種類存在した。さらに、B880 と B873 の中性子散乱強度分布には異なるショルダーが観測され、LH1 の内部構造の変化が反映されていると予想される。

[第4章: ^{13}C による BChl *a* の標識及び核磁気共鳴法による B820 由来 BChl *a* の特性評価]

本章では、第二章で確立した高濃度 B820 の再構成を行う手法を核磁気共鳴法に応用し、さらに重水素化された OG により、界面活性剤のマスキングを行うことで、LH1 のサブユニットである B820 の色素構造について解析することに成功した。核磁気共鳴法は、中性子小角散乱法と比較してさらに高濃度の試料が必要であるが、試料の精製度を改善することで、高濃度でも安定に存在する再構成 B820 を作製することが可能となった。これまで、膜タンパク質の周囲に界面活性剤がミセル構造を形成するため、分子運動が極度に抑えられた結果、膜タンパク質について NMR で測定するのは困難とされていた。特に B820 は色素膜タンパク質複合体のため、いまだその構造は明らかになっていない。B820 のミセル構造は、界面活性剤の性質に大きく依存し、界面活性剤の種類によっては NMR シグナルすら捕らえることは不可能になる。さらに、LH1 に含まれる色素は反磁性のため、色素由来のシグナルはタンパク質由来のものと重なり、色素のみのシグナルを帰属することは困難である。本章では、BChl *a* の選択的 ^{13}C 標識を行うことで、BChl *a* の有機溶媒中のモノマー構造、ならびに B820 中のダイマー構造由来の NMR シグナルを完全帰属することに成功した。その結果、各々の ^1H 、 ^{13}C の化学シフト値、シグナル強度は複雑に変化していることが確認され、B820 の色素構造はモノマー BChl *a* とは大きく異なる構造をとることが示唆された。特に、 3^2 位、 8^1 位、 10 位、 12^1 位の部位では ^1H シグナルの分裂が確認され、 8^2 位に至ってはシグナルが4つ確認され、大きく高磁場側にシフトしていることが確認された。さらに、この部位は NMR シグナル強度は低く、BChl *a* のバクテリオクロリン環平面のなかでも運動性は極度に低いことが明らかとなった。この結果から、BChl *a* の II、III 面で二つの BChl *a* が空間的

に重なっていることが予想される。一方、 2^1 位、 20 位、 18^1 位の部位では強度が強い NMR シグナルが確認され、この部位は運動性は比較的高いと考えられることから、BChl *a* の I, IV 面ではポリペプチドや OG に囲まれた部位であることが予想される。また、LH2 の X 線結晶構造解析からは、BChl *a* のカルボニル酸素と膜タンパク質のアミノ酸残基との水素結合が示唆されている。LH1 由来 B820 では、BChl *a* の 3^1 位では、 ^{13}C の化学シフトが大きく低磁場にシフトしていることが確認された。この結果、この部位にカルボニル酸素とアミノ酸残基との水素結合が存在することが示唆された。さらに BChl *a* の 13^1 位では同じ強度の ^{13}C シグナルがふたつ観測され、シグナルの分裂がはっきりと確認された。その結果、B820 中の二つの BChl *a* では 13^1 位周辺の環境は異なり、水素結合の様式が異なることが明らかとなった。

[第5章:安定同位体による LH1 ポリペプチドの標識及び核磁気共鳴法による

B820 活性部位周辺の構造解析]

本章では、第二章で確立した高濃度 B820 の再構成を行う手法に加え、タンパク質を安定同位体で標識することで、LH1 のサブユニット構造である B820 中の BChl *a* の周辺構造について解析することに成功した。B820 に含まれる二つのポリペプチドのうち、一方のみを選択的に ^{13}C で標識するハイブリッド B820 再構成を行うことで、各々のポリペプチドの情報のみを核磁気共鳴法で捕らえることで可能となった。これまで、ヘモグロビン等の色素タンパク質複合体では、活性部位に含まれる色素中の金属にアミノ酸残基である His が配位することにより、独自の機能を発現していた。しかし、色素膜タンパク質複合体である LH1 では、その疎水的な性質のため色素の配位構造について詳細な構造解析はほとんど行われていない。本章では、ハイブリッドで高濃度の B820 を再構成する方法を用いることで、BChl *a* に配位している His のイミダゾール環由来のシグナルを色素膜タンパク質複合体では初めて観測することに成功した。その結果、BChl *a* の環電流効果により、イミダゾール環の $\delta 2$ 位、 $\epsilon 1$ 位の ^1H シグナルが大幅に高磁場側にシフトしていることが確認され、BChl *a* の Mg が、イミダゾール環の $\epsilon 2$ 位に配位していることが実験により明らかとなった。また、活性部位周辺のアミノ酸残基が BChl *a* の影響により、同じく高磁場側にシフトしていることが観測された。第三章では、BChl *a* を選択的に ^{13}C で標識することで、B820 中の色素を観測することに成功したが、さらに B820 中の膜タンパク質を選択的に ^2H で標識することで、B820 に存在する BChl *a* のみのシグナルを、さらに高い選択性で観測することに成功した。その結果、BChl *a* のシグナルの帰属を確実に行うことが可能となった。さらに、BChl *a* について空間的に近い ^1H シグナルを検出することで、分裂していた色素由来のシグナルが、ダイマー構造に由来していることが確認され、BChl *a* が B820 中で重なりあっていることが示唆された。また、BChl *a* の 20 位周辺の I, IV 面は界面活性剤と接しており、比較的运动性が高い部位であるのに対し、一方の BChl *a* の 10 位は他方の BChl *a* の 8^2 位と空間的に近いことから、BChl *a* の II, III, V 面がお互いに face-to-face の配置で重なり合う構造であることが明らかとなった。この結果は第三章から得られた BChl *a* の特性と LH2 の X 線結晶構造解析の結果と一致していることから、本研究の妥当性を裏付けるものである。

[第6章:総括]

本研究では、太陽エネルギーを効率よく捕集する色素膜タンパク質複合体である LH1 について、B820 というサブユニット単位の高濃度再構成法を確立し、生物物理化学的手法を用いてその詳細な構造と機能の関連について解析し、人工光合成系の構築に必要な基礎的な研究を行った。今後、LH1 光捕集系の仕組みが解明されることにより、人工光合成システムが現実のものとなることが期待される。

論文審査結果の要旨

本学位論文は光合成器官の構造・機能解明と応用を目指したアンテナ色素・タンパク質の構造と機能に関する研究について述べたものである。資源・エネルギーの枯渇など我々を取り巻く様々な問題の解決を目指す研究の一環として光合成反応の積極的な活用方法が模索されている。生物系において太陽光を効率よく取り込んでいるアンテナ器官は人工光合成系の構築にも欠かせない重要な構成要素である。本論文は光合成反応とりわけその明反応過程で光エネルギーの集光、伝達機能を果たしている色素・タンパク質錯体であるアンテナの諸性質、特に、色素の会合構造と機能を光合成細菌について研究した論文で、全6章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章は本論文で特に解明を目指した、光合成細菌の膜内アンテナLH1が構成要素から再構成できる性質を利用して、LH1を構成するサブユニットB820を高濃度で再構成する方法を見いだした過程について述べている。 α 、 β サブユニットと色素であるバクテリオクロロフィルa2分子から構成されていると考えられているB820錯体をアポLH1と色素から高濃度で再構成するために必要な条件を検討し、高濃度再構成の手法を確立した。

第3章では、第2章で確立したB820の再構成法を用いて作製した高濃度B820を用いて、中性子小角散乱法を用い、そのサイズを評価した。可溶化溶媒に重水を、デタージェントに重水素化したオクチルグルコピラノサイドを用いて、中性子小角散乱実験を行うことにより、従来法では、これらが妨害となって測定が出来なかった、デタージェントミセルの部分を除いた、B820のみのサイズを評価することに成功し、そこから、B820が、同条件において、確かに、 α 、 β サブユニットと色素であるバクテリオクロロフィルa2分子から構成されている単位サブユニットであることを初めて実証した。

第4章は核磁気共鳴法(NMR)を利用したB820の特性評価について述べている。ここでも、第2章で確立した高濃度再構成法を活用し、あわせ、安定同位体 ^{13}C で標識した色素バクテリオクロロフィルaを用いることにより、色素部位由来のNMRシグナルを感度良く、選択的に観測することを可能とし、測定された色素炭素原子の帰属を全て明らかにした。この結果と、モノマー状態で存在するアセトン溶液中での色素のNMRシグナルとの比較から、色素二量体の構造について新しい重要な知見を得た。

第5章ではB820再構成時に、安定同位体 ^{15}N および ^{13}C で標識したタンパク質サブユニットを用いて高濃度で作製したB820のNMR測定結果から、タンパク質アミノ酸残基であるヒスチジンの配位を確認しその構造を決定出来た。また、重水素置換を行った α 、 β 両サブユニットを用いた高濃度再構成B820 NMRの解析から、B820色素二量体の近傍にあるプロトン対に関する距離情報を得た。この結果を第3章の ^{13}C バクテリオクロロフィルaを用いた際の構造的知見と合わせ、二量体色素の配置構造を明らかにしており、高く評価できる。

第6章は以上を総括している。

以上要するに本論文では、光生物が効率的に光エネルギーの捕獲に用いているアンテナ器官の構造と特性を天然の色素およびペプチドを安定同位体標識した試料を用いて光捕集タンパク質I (LH1) のサブユニットB820の高濃度再構成法を考案してこれを用いて種々の生物物理化学的な手法による研究を行いLH1の構造と特性評価を可能としたもので、アンテナタンパク質の工学的応用のための新しい知見を与えたものであり、生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。